

PCT/JP2004/004638
26.4.2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

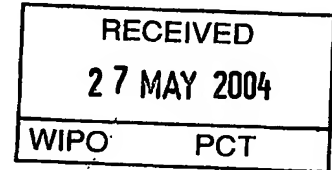
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2003年 9月30日

出 願 番 号
Application Number: 特願2003-340234
[ST. 10/C]: [JP2003-340234]

出 願 人
Applicant(s): 東陶機器株式会社



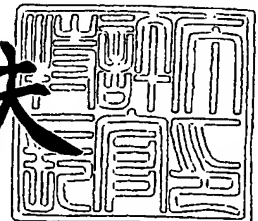
BEST AVAILABLE COPY

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 4月 7日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特2004-3028519

【書類名】 特許願
【整理番号】 K1030949
【提出日】 平成15年 9月30日
【あて先】 特許庁長官殿
【発明者】
 【住所又は居所】 福岡県北九州市小倉北区中島2丁目1番1号 東陶機器株式会社
 内
 【氏名】 曾根崎 修司
【発明者】
 【住所又は居所】 福岡県北九州市小倉北区中島2丁目1番1号 東陶機器株式会社
 内
 【氏名】 八木 晋一
【発明者】
 【住所又は居所】 福岡県北九州市小倉北区中島2丁目1番1号 東陶機器株式会社
 内
 【氏名】 大神 有美
【特許出願人】
 【識別番号】 000010087
 【氏名又は名称】 東陶機器株式会社
 【代表者】 木瀬 照雄
【先の出願に基づく優先権主張】
 【出願番号】 特願2003- 94429
 【出願日】 平成15年 3月31日
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 017640
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲

【請求項 1】

少なくとも表面の一部に二酸化チタンが存在する微粒子の表面がカルボキシル基を有する親水性高分子により修飾された生体分子固定化二酸化チタン複合体であって、該親水性高分子のカルボキシル基と二酸化チタンがエステル結合で結合しているとともに、該親水性高分子のカルボキシル残基に生体分子を固定化したことを特徴とする、生体分子固定化二酸化チタン複合体

【請求項 2】

前記微粒子は、粒径が2～200 nmであることを特徴とする、請求項 1 記載の生体分子固定化二酸化チタン複合体

【請求項 3】

前記微粒子は、磁性粒子と二酸化チタンからなる複合体であることを特徴とする、請求項 1～3 のいずれかに記載の生体分子固定化二酸化チタン複合体

【請求項 4】

前記二酸化チタンがアナターゼ型であることを特徴とする、請求項 1 または 2 記載の生体分子固定化二酸化チタン複合体

【請求項 5】

前記親水性高分子が水溶性高分子であることを特徴とする、請求項 1～4 のいずれかに記載の生体分子固定化二酸化チタン複合体

【請求項 6】

前記水溶性高分子がポリアクリル酸であることを特徴とする、請求項 5 記載の生体分子固定化二酸化チタン複合体

【請求項 7】

前記生体分子がアミノ酸、ペプチド、単純タンパク質、および複合タンパク質であることを特徴とする、請求項 1～6 のいずれかに記載の生体分子固定化二酸化チタン複合体

【請求項 8】

前記生体分子がヌクレオシド、ヌクレオチド、および核酸であることを特徴とする、請求項 1～6 のいずれかに記載の生体分子固定化二酸化チタン複合体

【請求項 9】

前記生体分子が単糖、糖鎖、多糖、および複合糖質であることを特徴とする、請求項 1～6 のいずれかに記載の生体分子固定化二酸化チタン複合体

【請求項 10】

前記生体分子が単純脂質、複合脂質、およびリポソームであることを特徴とする、請求項 1～6 のいずれかに記載の生体分子固定化二酸化チタン複合体

【書類名】明細書

【発明の名称】生体分子固定化二酸化チタン複合体

【技術分野】

【0001】

本発明は、癌細胞、内分泌攪乱物質などに対する分子認識能を有する抗体などの生体分子を固定化し、紫外線の照射などによってこれらの分解作用を示す生体分子固定化二酸化チタン複合体とその製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、内分泌攪乱物質の分子認識能を有するDNAなどの生体分子を支持体上に固定化した選択的吸着性を有する材料が環境浄化材料として提案されている（例えば、特許文献1参照）。一方、アナターゼ型二酸化チタンには光触媒作用があり、その強い酸化力により微生物、汚れ、悪臭物質等の有機物を分解することが知られている。現在では、二酸化チタンと活性炭やゼオライトなどの無機吸着剤を複合化することにより、二酸化チタンの分解効率を高めるような工夫がなされている（例えば特許文献2参照）。二酸化チタンの表面処理においても、パラジウムなどの還元反応促進触媒金属を二酸化チタン等の光触媒表面に析出させることで、光触媒の酸化、還元反応を促進することが考案されている（例えば、特許文献3参照）。

【0003】

しかしながら、DNA等による内分泌攪乱物質の選択的吸着材料については、吸着した内分泌攪乱物質等の確実な除去・分解手段が無く、かつ吸着飽和の問題から浄化能力にも限界がある。また、前記の二酸化チタンの光触媒としての能力を高めようとする考案についても、特定物質の吸着や分解を指向していない。したがって、例えば内分泌攪乱物質のみを選択的に吸着し分解することは不可能である。このように、生体分子により特定の物質を選択的に吸着してこれを光触媒の強い酸化力によって分解する、すなわち「選択的吸着能と光触媒能との組み合わせ」については知られていない。

【0004】

【特許文献1】特開2001-81098号公報

【特許文献2】特開平1-189322号公報

【特許文献3】特開昭60-14940号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、上記「選択的吸着能と光触媒能との組み合わせ」の問題を解決するためになされたものである。すなわち、本発明の課題は癌細胞、内分泌攪乱物質などに対する特異的分子認識能を有するタンパク質、抗体、核酸などの生体分子が固定化され、かつ紫外線の照射などによって癌細胞や内分泌攪乱物質の分解作用を示す生体分子固定化二酸化チタン複合体を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討を行い、二酸化チタン微粒子表面を親水性高分子で修飾した後に生体分子を固定化した複合体が、選択的吸着能と光触媒能を両立できることを見出し、本発明を完成した。

【0007】

すなわち、本発明の生体分子固定化二酸化チタン複合体はアナターゼ型二酸化チタン微粒子表面に親水性高分子を有し、該親水性高分子のカルボキシル基と二酸化チタンはエステル結合で結合しているとともに、前記親水性高分子のカルボキシル残基に生体分子を固定化したものである。本発明によれば、前記手法により生体分子と結合するカルボキシル基を含有する親水性高分子を二酸化チタンに結合することで、紫外線などの照射によって有機物の酸化還元作用を示す二酸化チタン粒子に、癌細胞や内分泌攪乱物質等の分子認識

能を有する抗体などの生体分子を固定化することが可能となる。また、この生体分子を固定化した二酸化チタン複合体を用いれば、抗体などの生体分子の、癌細胞や内分泌攪乱物質に対する分子認識能により、これらを選択的に捕捉することが可能となる。さらに、この生体分子固定化二酸化チタン複合体への紫外線の照射などによって、捕捉した物質の分解反応を行うことができる。

【発明の効果】

【0008】

本発明は、癌細胞、内分泌攪乱物質などに対する分子認識能を有するタンパク質、抗体、DNAなどの生体分子を、水溶性高分子で修飾したアナターゼ型二酸化チタン微粒子表面に固定することにより、これらに対する分子認識能を有し、かつ紫外線の照射などの光触媒作用によりこれら物質の分解反応を示す生体分子固定化二酸化チタン複合体を提供する。本複合体は水、または水溶液中で目的とする物質を特異的に認識捕捉し、紫外線照射などにより目的物質を強力に分解する能力を有する。特に水系で使用できること、目的物質を正確に捕捉できること、強力な光触媒能を有することは、例えば水系の内分泌攪乱物質の分解処理や癌細胞の破壊などの医療への応用に極めて有用である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

本発明の実施の形態を図面に基づいて具体的に説明する。図1は本発明の生体分子固定化二酸化チタン複合体を示す模式図である。本発明の生体分子固定化二酸化チタン複合体はアナターゼ型二酸化チタン微粒子(1)と、生体分子と結合するカルボキシル基を複数有する親水性高分子(2)をジメチルホルムアミドに分散させて、90~180℃で1~12時間水熱反応を行い、親水性高分子と二酸化チタンとの間でエステル結合を生成させた後、親水性高分子のカルボキシル残基に生体分子(3)を固定化させたものである。ここで、二酸化チタンと親水性高分子とがエステル結合するのは、粒子表面の酸化チタンが反応系中の水に水和されて水酸基が生成し、その水酸基と親水性高分子のカルボキシル基とが反応してエステル結合を形成することによるものである。エステル結合の確認方法としては種々の分析方法が適用できるが、例えば赤外分光法によりエステル結合の吸収帯である 1740 cm^{-1} 付近の赤外吸収の有無で確認することが可能である。また、生体分子の固定化には主に生体分子側のアミノ基が用いられる。しかし、アミノ基の無い生体分子であっても適切な修飾によりアミノ基を導入することは可能であり、あるいは生体分子にカルボキシル基と反応性のある所望の官能基や架橋を導入することも可能である。

【0010】

生体分子としては多種多様なものが考えられるが、最も利用されているものとしてタンパク質が挙げられる。本発明によれば、タンパク質として抗体、レセプターから低分子ペプチドまで好適に固定化が可能である。また、タンパク質の化学組成から二酸化チタン複合体への固定化にはアミノ基やチオール基、糖タンパクの場合ではアルデヒド基を固定化の際の標的官能基にすることが可能である。また、二酸化チタン複合体中のカルボキシル基にビオチンを固定化し、タンパク質をアビジンと架橋することにより、ビオチンとアビジンの相互作用を利用して固定化することも可能である。

【0011】

核酸の固定化を行う場合にはポリメラーゼ チェーン リアクション (PCR) によるDNA増幅の際に、アミノ化プライマー、ビオチン化プライマー、チオール化プライマーを用いて修飾DNAを合成することにより、同様の方法で二酸化チタン上へ固定化することが可能である。例えば、アミノ化DNAを固定化に用いる場合、あらかじめ二酸化チタン複合体のカルボキシル基にN-ヒドロキシこはく酸イミド (NHS) のようなエステルを導入し、求核置換反応により二酸化チタン複合体へ共有結合させることが可能である。チオール化DNAを用いる場合も、カルボキシル基にNHSを反応させた後に、2-(2-ピリジニルジチオ) エタンアミンを用いることによりDNA分子を二酸化チタン上へ固定化することが可能である。

【0012】

アルデヒド基を用いる場合は、カルボキシル基にNHSを反応させた後に、ヒドラジンを

用いることにより生体分子を二酸化チタンに結合し、シアノホウ素化ナトリウムで還元すれば良い。この他、ビオチンヒドラジドやアミノ化ビオチンを用いてカルボキシル基をビオチン化させれば、容易にアビジン化した生体分子を二酸化チタン上に導入できる。このように適宜、試薬、修飾および架橋の方法を選択すれば、二酸化チタン上に導入したカルボキシル残基に多種多様な生体分子を固定することが可能である。

【0013】

本発明で用いる親水性高分子としては、生体分子固定化二酸化チタン複合体を水溶液中に分散した状態で使用することを想定しているため、水溶性高分子であることが望ましい。本発明で用いる水溶性高分子の例としては、カルボキシメチルデンプン、カルボキシメチルデキストラン、カルボキシメチルセルロース、ポリアクリル酸などが挙げられるが、水溶性高分子の加水分解性の観点からポリアクリル酸であることが望ましい。

【0014】

また、本発明で用いる二酸化チタン粒子としては、癌治療用として体内への適用の場合など、その使用形態の自由度の観点から分散粒径が2~200 nmであることが望ましい。さらに、本発明で用いる二酸化チタンとしては、光触媒活性の観点からアナターゼ型であることが望ましい。

【0015】

さらに、上述した改質アナターゼ型二酸化チタンが少なくとも表面に存在すれば、たとえば磁性粒子と二酸化チタンとの複合体のようなものであっても、水溶液中での特性は近似し、かつカルボキシル基を介した生体分子の固定化は可能であるため、同様の製造法、精製法を適用することができる。

【実施例】

【0016】

以下、本発明を実施例に従って詳細に説明する。ただし、本発明はこの実施例に制限されるものではない。

【0017】

(実施例1)

酸化チタン粒子へのポリアクリル酸の導入

チタンテトライソプロポキシド3.6 gとイソプロパノール3.6 gを混合し、氷冷下で60 mlの超純水に滴下して加水分解を行った。滴下後に室温で30分間攪拌した。攪拌後、12 N硝酸を1 ml滴下して、80 °Cで8時間攪拌を行い、ペプチゼーションした。ペプチゼーション終了後、0.45 μ mのフィルターで濾過し、脱塩カラム (PD10; アマシャム ファルマシア バイオサイエンス社製) を用いて溶液交換して固形成分1 %のアナターゼ型二酸化チタンゾルを調製した。

この分散液を100 mlのバイアル瓶に入れ、200 Hzで30分間超音波処理を行った。超音波処理を行う前と後での平均分散粒径はそれぞれ、36.4 nm、20.2 nmであった。超音波処理後、溶液を濃縮して固形成分20 %のアナターゼ型二酸化チタンゾルを調製した。

得られたアナターゼ型酸化チタンゾル0.75 mlを20 mlのジメチルホルムアミド(DMF)に分散させ、ポリアクリル酸 (平均分子量: 5,000、和光純薬社製) 0.2 gを溶解したDMFを10 ml添加後、攪拌して混合した。水熱反応容器に溶液を移し変え、180 °Cで6時間水熱合成を行った。反応終了後、反応容器温度が50 °C以下になるまで冷却し、溶液を取り出した後に水80 mlを添加して攪拌混合した。エバポレータでDMFおよび水を除去した後に、再度、水20 mlを添加してポリアクリル酸結合アナターゼ型二酸化チタン水溶液とした。2 N塩酸1 mlを添加して二酸化チタン粒子を沈殿させて、遠心後に上清を除去することにより未反応のポリアクリル酸を分離した。再度水を添加して洗浄を行い、遠心後に水を除去した。50 mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) を10 ml添加後、200 Hzで30分間超音波処理を行い、二酸化チタン粒子を分散させた。超音波処理後、0.45 μ mのフィルターで濾過し、固形成分1.5 %のポリアクリル酸結合アナターゼ型二酸化チタンゾルを得た。作製したポリアクリル酸結合アナターゼ型二酸化チタン微粒子の分散粒径を測定したところ、45.5 nmであった。

【0018】

(実施例2)

ポリアクリル酸結合二酸化チタン微粒子への抗体分子の固定化

実施例1により得たポリアクリル酸結合アナターゼ型二酸化チタンゾル1 mlを脱塩カラムPD10を用いて溶液交換を行い、水に分散したポリアクリル酸結合アナターゼ型二酸化チタンゾル3 mlを得た。この溶液1.5 mlに200 mM 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドと50 mM N-ヒドロキシコハク酸イミド(NHS)の混合液0.1 mlを添加して10分間攪拌を行い、カルボキシル基を活性化した。攪拌終了後、10 mM酢酸緩衝液(pH 5.0)で平衡化したPD10を用いて溶液交換し、10 mM酢酸緩衝液(pH 5.0)に分散したカルボキシル基活性化ポリアクリル酸結合アナターゼ型二酸化チタンゾル3 mlを得た。同一の緩衝液で調製した抗 α -フェトプロテイン(以下、抗AFPと言う)ポリクローナル抗体(ヤギIgG、SC-8108;コスモバイオ社製)を0.05 mg/mlになるように添加した。室温で15分間攪拌後、0.5 Mになるようにエタノールアミン塩酸塩水溶液(pH 8.5)を添加した。10分間攪拌後、2 N塩酸を1 ml添加してアナターゼ型二酸化チタン粒子を沈殿させ、遠心後に上清を除去した。再度水を添加して洗浄を行い、遠心後に水を除去した。50 mMリン酸緩衝液(pH 7.0)を2.5 ml添加した後、200 Hzで30分間超音波処理を行い、二酸化チタン粒子を分散させた。超音波処理後、0.45 μ mのフィルターで濾過し、固形成分0.3 %の抗AFPポリクローナル抗体固定化アナターゼ型二酸化チタンゾルとした。作製した抗AFP抗体固定化二酸化チタン複合体の分散粒径を測定したところ、52.8 nmであった。

【0019】

(実施例3)

ポリアクリル酸結合二酸化チタン微粒子へのモノクローナル抗体分子の固定化

実施例1により得たポリアクリル酸結合アナターゼ型二酸化チタンゾル1 mlを脱塩カラムPD10を用いて溶液交換を行い、水に分散したポリアクリル酸結合アナターゼ型二酸化チタンゾル3 mlを得た。この溶液1.5 mlに200 mM 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドと50 mM N-ヒドロキシコハク酸イミド(NHS)の混合液0.1 mlを添加して10分間攪拌を行い、カルボキシル基を活性化した。攪拌終了後、10 mM酢酸緩衝液(pH 5.0)で平衡化したPD10を用いて溶液交換し、10 mM酢酸緩衝液(pH 5.0)に分散したカルボキシル基活性化ポリアクリル酸結合アナターゼ型二酸化チタンゾル3 mlを得た。同一の緩衝液で調製した抗ヒト血清アルブミン(以下、抗HSAと言う)モノクローナル抗体(マウスIgG、MSU-304;コスモバイオ社製)を0.05 mg/mlになるように添加した。室温で15分間攪拌後、0.5 Mになるようにエタノールアミン塩酸塩水溶液(pH 8.5)を添加した。10分間攪拌後、2.5 M NaCl, 20 % (w/v) ポリエチレングリコールを等量添加し、アナターゼ型二酸化チタン粒子を沈殿させ、遠心後に上清を除去した。再度水を添加して洗浄を行い、遠心後に水を除去した。PBS (日本ジーン)を2.5 ml添加し、二酸化チタン粒子を分散させた。0.45 μ mのフィルターで濾過し、固形成分0.3 %の抗HSAポリクローナル抗体固定化アナターゼ型二酸化チタンゾルとした。作製した抗AFP抗体固定化二酸化チタン複合体の分散粒径を測定したところ、52.8 nmであった。

【0020】

(実施例4)

ポリアクリル酸結合二酸化チタン微粒子へのストレプトアビジン分子の固定化

実施例1により得たポリアクリル酸結合アナターゼ型二酸化チタンゾル1 mlを脱塩カラムPD10を用いて溶液交換を行い、水に分散したポリアクリル酸結合アナターゼ型二酸化チタンゾル3 mlを得た。この溶液1.5 mlに200 mM 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドと50 mM N-ヒドロキシコハク酸イミド(NHS)の混合液0.1 mlを添加して10分間攪拌を行い、カルボキシル基を活性化した。攪拌終了後、10 mM酢酸緩衝液(pH 5.0)で平衡化したPD10を用いて溶液交換し、10 mM酢酸緩衝液(pH 5.0)に分散したカルボキシル基活性化ポリアクリル酸結合アナターゼ型二酸化チタンゾル3 mlを得た。ストレプトアビジン(Pierce Biotechnology Inc. コード:21126)を0.05 mg/mlになるように添加した。室温で15分間攪拌後、0.5 Mになるようにエタノールアミン塩酸塩水溶液(pH

8.5) を添加した。10分間攪拌後、2.5 M NaCl, 20 % (w/v) ポリエチレングリコールを等量添加し、アナターゼ型二酸化チタン粒子を沈殿させ、遠心後に上清を除去した。再度水を添加して洗浄を行い、遠心後に水を除去した。PBS (日本ジーン) を2.5 ml添加し、二酸化チタン粒子を分散させた。0.45 μ mのフィルターで濾過し、固形成分0.3 %の抗HSAポリクローナル抗体固定化アナターゼ型二酸化チタンゾルとした。作製した抗AFP抗体固定化二酸化チタン複合体の分散粒径を測定したところ、50.5 nmであった。

【0021】

(実施例5)

ポリアクリル酸結合磁性粒子 - 酸化チタン複合体へのモノクローナル抗体の導入
セパラブルフラスコ内にポリオキシエチレン(15)セチルエーテル (C-15: 日本サーファクタント工業) を45.16 gを溶解させ、5 min窒素置換した後、シクロヘキセン溶液 (和光純薬) 75 mlを添加、0.67 mol/l FeCl_2 (和光純薬) 水溶液3.6 mlを添加し、250 rpmで攪拌しながら、30 % アンモニア水溶液 5.4 mlを添加し、1時間反応させた。

その後、50mMテトラエチルオルソシリケート水溶液 (和光純薬工業) を0.4 ml滴下し、1時間反応させた。その後、チタンテトライソプロポキシド (和光純薬工業) を最終濃度 0.005 M になるように加えた。50 (w/v) % エタノール水溶液 10 ml を1 ml ずつ 10 分間隔で添加した。

水溶液を遠心分離し、沈殿物を350℃で2時間焼成した。焼成後、10 mM 硝酸水溶液に分散させ、超音波処理後、0.1 μ mのフィルターでろ過した。

得られた磁性粒子 - 酸化チタン複合体ゾル0.75 mlを20 mlのジメチルホルムアミド(DMF)に分散させ、ポリアクリル酸 (平均分子量: 5,000、和光純薬) 0.3 gを溶解したDMF 10 mlを添加後、攪拌して混合した。水熱反応容器 (HU-50、三愛科学) に溶液を移し変え、180 °Cで6時間合成を行った。

反応終了後、反応容器温度が50 °C以下になるまで冷却し、分液漏斗に溶液を取り出した後、水10 mlを添加して攪拌混合した。次いで、クロロホルムを40 ml 加え、攪拌混合し下層を除去し、上層を回収した。このステップを2回繰り返し、DMFを除去した。

この溶液10 ml に 10 ml の 1.5 M NaCl、20 % (w/v) ポリエチレングリコール6000 (和光純薬) を加え、遠心後に上澄を除去した。沈殿に 2.5 ml の水を加え、Sephadex G-25 カラムによりゲルろ過を行いポリアクリル酸結合磁性粒子 - 酸化チタン複合体微粒子分散液を得た。この分散液1.5 mlに200 mM 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミドと50 mM N-ヒドロキシコハク酸イミド (NHS) の混合液0.1 mlを添加して10分間攪拌を行い、カルボキシル基を活性化した。攪拌終了後、10 mM酢酸緩衝液 (pH 5.0) で平衡化したPD10を用いて溶液交換し、10 mM酢酸緩衝液 (pH 5.0) に分散したカルボキシル基活性化ポリアクリル酸結合アナターゼ型二酸化チタンゾル3 mlを得た。同一の緩衝液で調製した抗ヒト血清アルブミン (以下、抗HSAと言う) モノクローナル抗体 (マウスIgG、MSU-304; コスモバイオ社製) を0.05 mg/mlになるように添加した。室温で15分間攪拌後、0.5 Mになるようにエタノールアミン塩酸塩水溶液 (pH 8.5) を添加した。10分間攪拌後、2.5 M NaCl, 20 % (w/v) ポリエチレングリコールを等量添加し、アナターゼ型二酸化チタン粒子を沈殿させ、遠心後に上清を除去した。再度水を添加して洗浄を行い、遠心後に水を除去した。PBS (日本ジーン) を2.5 ml添加し、二酸化チタン粒子を分散させた。0.45 μ mのフィルターで濾過し、固形成分0.3 %の抗HSAポリクローナル抗体固定化アナターゼ型二酸化チタンゾルとした。作製した抗AFP抗体固定化二酸化チタン複合体の分散粒径を測定したところ、105 nmであった。

【0022】

(実施例6)

抗AFP抗体固定化二酸化チタン複合体による抗原AFPの分解

α -フェトプロテイン (コスモバイオ社製、以下、AFPと言う) を1 μ g/mlになるように50 mMリン酸緩衝液 (pH 7.0、100 mM NaClを含む) で希釈し、実施例2で作製した抗AFPポリクローナル抗体固定化二酸化チタン複合体を固形成分0.01 %になるように添加した。次いで、37 °Cで3時間静置して抗原抗体反応による凝集体を形成させた。AFPと抗AFPポリ

クローナル抗体固定化二酸化チタン複合体が凝集体を形成したことから、抗AFPポリクローナル抗体固定化二酸化チタン複合体が特異的にAFPを認識していることは明らかである。

攪拌しながら、本凝集体に波長340 nmの紫外光を1 mW/cm²になるように照射し、600 nmにおける波長の吸収（凝集体の濁度）を紫外-可視分光光度計により測定した。結果を図2に示す。紫外線照射時にのみ凝集体濃度の低下にともなう吸光度の減少が認められることから、抗AFPポリクローナル抗体固定化二酸化チタン複合体の光触媒作用により、AFPの分解が起こっていることは明らかである。

【0023】

(実施例7)

生体分子固定化ポリアクリル酸結合二酸化チタン微粒子の抗原-抗体反応の確認

HSA（コスモバイオ社製、以下、HSAと言う）を250 μg/mlになるように50 mMリン酸緩衝液（pH 7.0、100 mM NaClを含む）で希釈し、400 mM 1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミドと100 mM N-ヒドロキシコハク酸イミド（NHS）の混合液で活性化したセンサチップC1（BIACORE）へ 流速 10 μl/mlでBIACORE1000（BIACORE）により通液して行った後、0.1 M エタノールアミンにより活性基のブロッキングを行い、HSA固定化センサチップとして用いた。HSA固定化センサチップへ実施例3で作製した0.01 %の抗HSAモノクローナル抗体固定化アナターゼ型二酸化チタンゾルおよび実施例4で作製した0.01 %のストレプトアビジン固定化アナターゼ型二酸化チタンゾルを送液し、抗原との反応性を確認した。結果を図3に示す。HSA固定化センサチップに対し、抗HSAモノクローナル抗体固定化二酸化チタン粒子は反応しているが、ストレプトアビジン固定化二酸化チタン粒子は反応せず、二酸化チタン上へ固定化された抗HSAモノクローナル抗体は抗体としての活性を保持していることが確認された。

【0024】

(実施例8)

抗HSA抗体固定化二酸化チタン複合体による抗原HSAの分解

HSAを20 ng/mlになるようにPBS緩衝液（日本ジーン）で希釈し、実施例3で作製した抗HSAモノクローナル抗体固定化二酸化チタン複合体を固形成分0.01 %になるように添加した。次いで、室温で30分放置後、波長340 nmの紫外光を1 mW/cm²になるように照射し、15分毎にサンプリングを90分間行った。同様に実施例4で作製したストレプトアビジン固定化二酸化チタン複合体も同様に行った。

抗HSAポリクローナル抗体（家兎製）を250 μg/mlになるように50 mMリン酸緩衝液（pH 7.0、100 mM NaClを含む）で希釈し、400 mM 1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミドと100 mM N-ヒドロキシコハク酸イミド（NHS）の混合液で活性化したセンサチップC1（BIACORE）へ 流速 10 μl/mlでBIACORE1000（BIACORE）により通液して行った後、0.1 M エタノールアミンにより活性基のブロッキングを行い、抗HSAポリクローナル抗体固定化センサチップとして用いた。各サンプルの抗原性を抗HSAポリクローナル抗体固定化センサチップに20 μl 送液し、2次抗体として家兎製抗HSAポリクローナル抗体 50 μg/ml を 10 μl 送液しサンドイッチアッセイをおこなった。抗体送液後10秒後のRU値を測定し、UV未照射時の値を100 %として各サンプルの結合量を相対値として図4に示す。抗HSAモノクローナル抗体固定化アナターゼ型二酸化チタンゾルは固定化二酸化チタンゾルに比べて分解速度が非常に速く、抗体が固定化された酸化チタンは目的物の特異的分解に有効であることが示された。


【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】本発明の生体分子固定化アナターゼ型二酸化チタン複合体を示す模式図である。

【図2】本発明の抗体固定化二酸化チタン複合体による抗原の分解活性（吸光度の減少として表示）の結果を示す図である。

【図3】本発明の抗体固定化二酸化チタン複合体が抗原との結合性を有していること

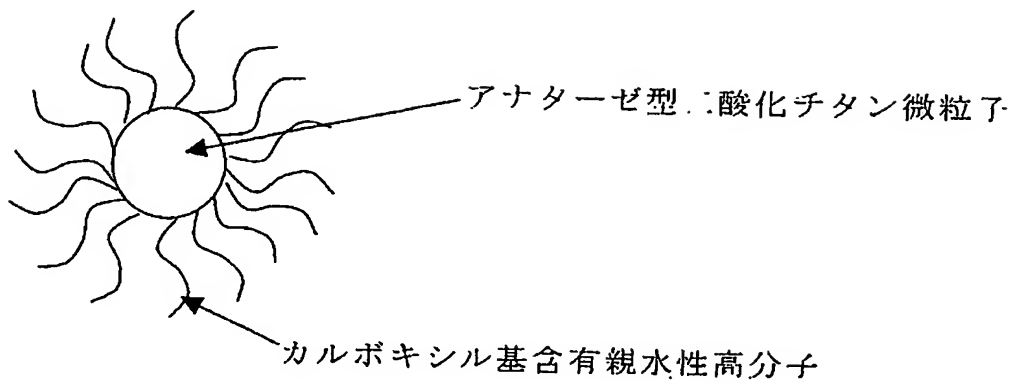


を示す図である。

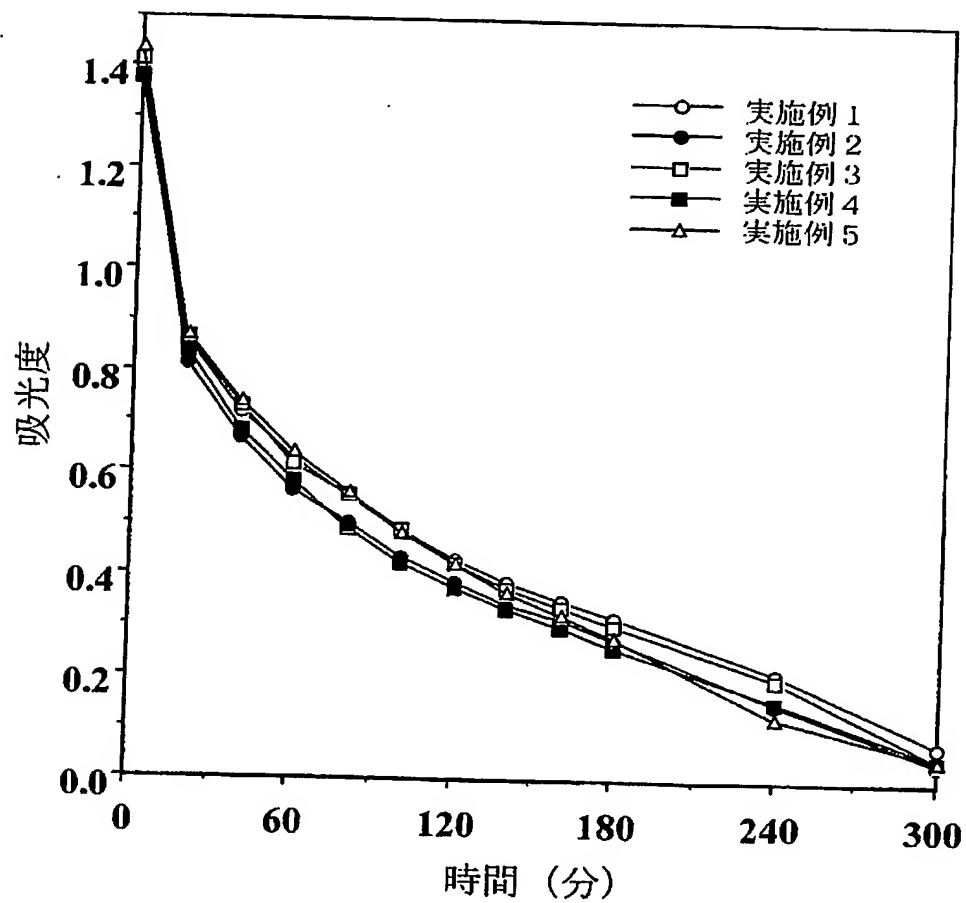
【図 4】本発明の抗体固定化二酸化チタン複合体による抗原の分解活性（抗原分解に伴う抗体との結合量低下）の結果を示す図である。

【書類名】図面

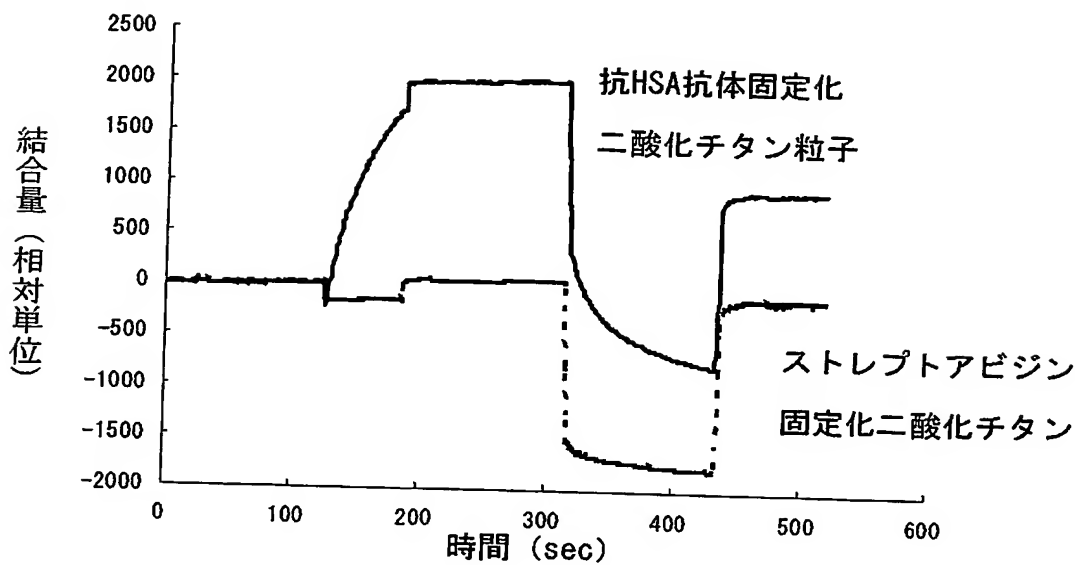
【図 1】



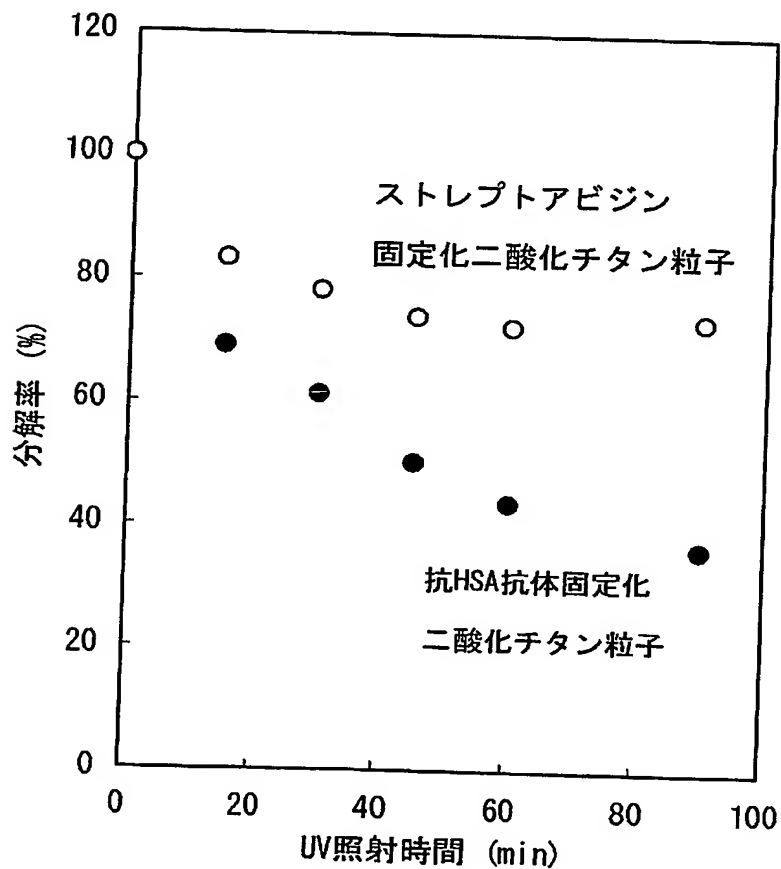
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 癌細胞や内分泌攪乱物質などに対する分子認識能を有する抗体などの生体分子を固定化した、紫外線の照射などによって有機物の酸化還元作用を示す、生体分子固定化二酸化チタン複合体を提供する。

【解決手段】 カルボキシル基を複数含む親水性高分子のカルボキシル基と、アナターゼ型二酸化チタンとをエステル結合で結合させ、その親水性高分子のカルボキシル残基に生体分子を固定化した生体分子固定化二酸化チタン複合体を得る。

【選択図】 図 1

特願 2 0 0 3 - 3 4 0 2 3 4

ページ： 1/E

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 1 0 0 8 7]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 2 7 日

[変更理由]

新規登録

住 所

福岡県北九州市小倉北区中島 2 丁目 1 番 1 号

氏 名

東陶機器株式会社

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images
problems checked, please do not report the
problems to the IFW Image Problem Mailbox**